

4.3 特殊因素 孕妇血清筛查应考虑的问题还有:随体质量的增加孕妇血清 AFP、hCG、uE3 下降。胰岛素依赖性糖尿病患者 AFP 水平低于正常值,吸烟者 hCG 低于 20%~30%。目前产前筛查主要应用于单胎妊娠,由于诸多因素影响在双胎中应用有一定困难。如有上述情况,应进行校正,特别是 AFP 中倍数值的校正。

5 小 结

产前筛查是一种无创痛、方便、经济的检查方法,可以减少盲目的侵入性产前诊断,目前已被证实可在孕中期有效地检出 DS 高危患儿。通过对孕妇血清标志物的测定及超声筛查,结合孕妇年龄、家族史、生育史及超声核实胎龄,对筛查出的高危孕妇再进行羊水染色体分析确诊,并及时终止妊娠,既减轻孕妇家庭负担,也减少了 DS 患儿的出生,为提高人口素质起到了重要的作用。

总之,在知情同意的原则下,提高孕妇对产前筛查的认识,自觉自愿检查,达到优生、提高人口素质的目的。

参考文献

[1] 李璞.医学遗传[M].2 版.重庆:重庆大学出版社,2006:171.
[2] 周林峰.唐氏综合征产前筛查与诊断的研究[J].中国妇幼保健,2005,14(20):1728-1729.
[3] 李辉,王德智.唐氏综合征产前筛查的进展[J].中国实用妇科与产科杂志,2008,24(1):8-10.

[4] 李军红.唐氏综合征的产前诊断进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2006,27(18):2241-2242.
[5] Bogart MH ,Pandian MR,Jones OW. Abnormal mternal serum human choronic gohadotropin level in pregnancies with fetal chromosome abnormalities[J]. Prenst Diagn, 1987,7(9):623-630.
[6] Canick JA,Knight GJ,Palomaki GE,et al. Low second trimester maternal serum estriol in drown syndrome pregnenices[J]. Am J Hum Genet,1987,41:269.
[7] 俞菁,李雪华,龚波. 妊娠血清标志物筛查唐氏综合征的研究进展[J]. 中国医药导刊,2009,11(4):651-653.
[8] 尹向东. 21-三体综合征产前筛查新进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2003,24(6):349-350.
[9] 卓乐雯,廖灿. 唐氏综合征产前筛查研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2004,20(7):414-416.
[10] Haddow JE, Palomaki GE,Knight GJ,et al. Screening of maternal serum for fetal Down’s syndrome in the first teimester[J]. N Engl J Med,1998,338(14):955-961.
[11] 郑辉. 唐氏综合征孕中期母血筛查及羊水诊断[J]. 中国热带医学,2007,7(1):91-92.
[12] 刘伟芬. 唐氏综合征(DS)产前筛查的研究[J]. 吉林医学,2008,29(5):419-420.

(收稿日期:2011-05-26)

荧光原位杂交技术在产前诊断中的临床应用

韦家伟 综述, 梁 昕 审校 (广西壮族自治区柳州市妇幼保健院检验科 545001)

【关键词】 荧光原位杂交技术; 羊水; 产前诊断
DOI:10.3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 20. 042 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)20-2509-03

荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization,FISH)技术是 20 世纪 80 年代在细胞遗传学、分子遗传学基础上发展起来的一种新技术,采用荧光标记的 DNA 序列作为探针,利用探针与被检测样本中 DNA 的互补,在探针与样本 DNA 杂交后,荧光显微镜下观察杂交信号,从而检测标本中的染色体或基因异常。FISH 技术为一种快速、灵敏的检测方法,克服了传统的细胞遗传学诊断取材时间有限、培养耗时长、结果取决于中期裂相的多少、分散的好坏、显带是否适中等不足,只需根据杂交位点的数目即可迅速确定染色体的数目,结果更客观、准确、可靠。可以在获取标本后 24~48 h 出结果,对于及时实施临床决策以及缓解孕妇等待结果时的焦虑情绪有重要的作用,在临床的应用日益广泛。

1 FISH 技术

FISH 技术是利用染色体特殊区域特异性 DNA 或中期染色体 DNA 进行杂交,用荧光作为检测系统进行检测的一种原位杂交方法,以其简便、快速、敏感等优点,广泛用于染色体数目与结构畸变甚至基因水平畸变的诊断^[1]。其原理是:将荧光标记的核酸分子在变性后与已变性的靶核酸在退火温度下复性,而后通过荧光显微镜观察荧光信号,在维持原位的前提下对靶核酸进行分析,检测染色体数目和结构异常。其基本操作步骤可概括为制备染色体、标记探针、将探针与实验材料靶序列杂交以及检测杂交结果。FISH 技术检测快速,克服了传统

的细胞遗传诊断取材时间有限、培养耗时长、结果取决于中期裂相的多少、分散的好坏、显带是否适中等不足。可以在 24~48 h 内出结果,在观察结果的时候仅需进行细胞计数、辨认杂交信号的有无与多少,具有操作简便,灵敏性、特异性强等优点^[2],有利于快速准确地做出诊断。此外,还能分析一部分显带染色体技术不易分辨的异常,如某些倒位、微小缺失、额外的微小标记染色体、复杂畸变等。FISH 技术的独特探针,可有针对性、特异地检测出染色体结构的异常。Lissauer 等^[3]应用 FISH 技术检测出 del(1)(1p36),能够明确诊断出染色体的缺失。新近应用 FISH 技术对 dup(1)(q41q44)的检测更说明 FISH 技术在对重复片段的检测中具有重要的作用^[4]。目前学者们通过 FISH 技术检测出多种染色体结构异常,如 X 染色体 q22.1 末端缺失^[5]、新生儿先天性心脏病最常见的遗传性原因 22q11.2 缺失所致的 DiGeorge 综合征^[6],以及 8p;21q 易位^[7]等。在检测微小缺失、重排等染色体结构异常方面,是传统细胞学分析无法取代的^[8]。

2 FISH 在染色体产前诊断中的应用

染色体病对人类的危害越来越重,目前已报道的染色数目和结构异常 500 种以上^[9],随着分子生物学等技术不断发展,将会发现更多的染色体异常。对于染色体异常诊断,传统的细胞遗传学方法往往采用细胞培养与染色 G 显带法,该方法所得结果的可靠性取决于染色体的分散,收获的中期分裂相的数

量和显带的质量。FISH 技术不仅可用于中期分裂相,还可在间期细胞显示杂交信号,尤其适用于那些培养难以成功的各种组织细胞。

2.1 未培养的羊水细胞中分析胎儿染色体异常 Tepperberg 等^[10]用 13、18、21、X、Y 染色体特异性探针,对 5 348 例妊娠妇女未培养的羊水间期细胞进行 FISH 检测,可在羊膜腔穿刺 24~48 h 内快速诊断出这些染色体的非整倍体,且查出的异常核型都经随后流产出的胎儿核型证实。所有检测成功的样本都在抽取羊水后 2~3 d 内获得结果;相比传统的染色体核型分析,FISH 大大地缩短了诊断时间,有利于缓解孕妇等待结果时的焦虑情绪,也使临床决策能及时实施,还能对同一样本进行多次检测。

2.2 FISH 与胚胎 PGD PGD 是对体外受精的胚胎进行遗传学诊断,是辅助生殖技术与分子生物学技术相结合发展的产前诊断技术。自 PGD 概念提出以来,由于植入前胚胎能用于遗传学分析的细胞数量有限(通常为 1~2 个)且为间期细胞,致使 PGD 技术发展缓慢。FISH 技术在植入前诊断染色体非整倍体及胚胎性别获得成功,使 PGD 技术得到较快发展。目前,FISH 是用于检测胚胎单一细胞染色体数目异常的惟一有效方法^[8]。随着首例植入前性别诊断婴儿顺利出生,FISH 技术可对性连锁隐性遗传病基因携带者进行植入前性别诊断,选择适宜胚胎植入子宫可避免患儿的出生^[11]。目前应用于植入前性别诊断的方法有 PCR 和 FISH,在对植入前胚胎某些染色体结构异常的诊断中也起到一定的作用。而这些染色体结构的异常往往导致自发流产及习惯性流产,已有研究用于某些染色体的倒位和某些易位染色体携带者的筛查^[12],使 PGD 检测后的妊娠自发流产率下降。

2.3 母血中分析胎儿染色体异常 自从发现母亲血液循环中可能存在胎儿细胞开始,从母亲外周血分离胎儿细胞进行产前诊断就引起广泛关注,但由于母亲外周血中胎儿细胞很少,给传统的细胞培养染色体分析带来了很大的困难。自从 FISH 和聚合酶链反应(PCR)技术问世以来该领域的研究有了很大进展^[8]。Price 等最早从孕 10 周孕妇的血液中分离出胎儿核红细胞,并以 X、Y 和 18 号染色体特异性探针进行荧光原位杂交,出现了 3 种染色体的杂交信号。Yang^[13]等取 30 例高龄妊娠妇女外周血,经三倍梯度离心,分离胎儿有核红细胞筛查 21-三体综合征,成功地检测出 3 例阳性,其结果被传统羊水细胞核型分析所证实。以上结果表明,采取母血分析胎儿染色体异常是产前诊断中最安全的一种手段。

3 FISH 的优点

与传统的细胞遗传学相比,FISH 的最大优势就是它不局限于分裂期细胞,可以直接检测未培养羊水细胞间期核,此技术快速准确,平均在 24 h 内得出诊断结果,在短时间内为减轻身心负担,而且具有操作简单、灵敏性、特异性强等优点。常见的 13 号、18 号、21 号、X 和 Y 5 条染色体非整倍体发生率约占所有染色体非整倍体发生率的 65%,占所有染色体异常活婴的 95%^[14]。应用多色 FISH 技术,可以对 13 号、18 号、21 号、X 和 Y 染色体数目同时检测,能满足绝大多数染色体病的产前诊断需要。对于所有发现的非整倍体,FISH 的敏感性为 99.6%,特异性 99.9%^[15]。对于传统的细胞遗传学显带技术对染色体上微小缺失及结构的微小异常如重排等很难检测出来,而 FISH 技术采用相应的探针与标本进行杂交能迅速、高效地检测出来。

4 FISH 的局限性

用一种探针往往只能检测出一种异常,对同时存在多种异

常染色体需采用多个探针进行检测,成本势必增加,并且还存在一定的假阳性和假阴性。易位型 21-三体综合征往往因为染色体短臂断裂、丢失或着丝粒融合,将导致常规 FISH 检测漏诊,也是检测中出现假阴性的主要原因^[16]。此外,母体外周血中胎儿细胞数量极少,目前还没有一种可靠的特异性检测手段可以简单地将母体外周血中的胎儿细胞分离出来。

5 FISH 的常见问题

在 FISH 中最重要的因素是温度、光照、湿度和各种试剂的 PH 值。温度和湿度直接影响着探针和目标 DNA 的杂交效率;光照影响了荧光染料的强度;各种试剂 pH 是否符合要求直接关系到 FISH 的稳定性。同一个探针和样本在夏季成功,但是在冬季得不懂理想的效果,可能是 FISH 操作的环境温度发生了变化导致的。在我国,冬季普遍比夏季寒冷,低的环境温度使 FISH 得不到良好的杂交效率。此外,探针的保存不当也容易引起荧光素的淬灭而导致效果不佳。因此,保证 FISH 操作中的温度非常重要。要尽可能地保持操作环境温度在 20℃ 以上,对于在冬季进行的 FISH 操作尤为重要。此外,对于需要预热以达到要求温度的试剂,在使用前必须使用温度计对其进行测温。特别是在冬季,盖玻片本身温度就低,加之探针的量本就不多(10 μL),因此,事先没有预热的盖玻片会使得杂交液的温度急剧下降,严重地影响了探针和目标 DNA 的杂交效率。因此,对上述小部件的预热也能有效地提高 FISH 的杂交效果。

6 FISH 技术的应用前景

传统核型分析方法对实验室技术有较高要求,而且劳动强度大、检测周期长、容易发生培养失败等缺点^[17]。与传统的染色体显带核型分析相比,FISH 适用于细胞周期的所有阶段,所需要的羊水细胞量少,不受孕周限制。对于常见染色体非整倍体的检测,具有快速、特异和高效的特点,适应了临床的需要,给产前诊断领域带来了巨大的应用前景。但是 FISH 技术还不能完全取代传统的细胞遗传学,二者联合应用,可提高产前诊断的效率,相信随着实验技术的不断改进和成熟,其临床应用会更加广阔。

参考文献

- [1] Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2007, 145(1): 87-98.
- [2] 黄莉,曾瑄,谢丹尼,等.应用荧光原位杂交技术产前诊断 Down 综合征[J]. 广西医科大学学报, 2007, 24(1): 84-86.
- [3] Lissauer D, Larkins SA, Sharif S, et al. Prenatal diagnosis and prenatal imaging features of fetal monosomy 1p36[J]. Prenat Diagn, 2007, 27(9): 874-878.
- [4] Cocce MC, Villa O, Obregon MG, et al. Duplication dup(1)(q41q44) defined by fluorescence in situ hybridization; delineation of the trisomy 1q42 qter syndrome[J]. Cytogenet Genome Res, 2007, 118(1): 84-86.
- [5] Vaglio A, Greif G, Bernal M, et al. Prenatal and postnatal characterization of a de novo Xq22.1 terminal deletion[J]. Genet Test, 2006, 10(4): 272-276.
- [6] McClarren J, Donnenfeld AE, Ravnan JB. Prenatal diagnosis of an unexpected interstitial 22q11.2 deletion causing truncus arteriosus and thymic hypoplasia in a ring 22 chromosome derived from a maternally inherited paracentric

- tric inversion[J]. Prenat Diagn, 2006, 26(13): 1212-1215.
- [7] Ozkinay F, Kanit H, Onay H, et al. Prenatal diagnosis of de novo unbalanced translocation 8p; 21q using subtelomeric probes[J]. Genet Couns, 2006, 17(3): 315-320.
- [8] 许多, 王晨虹. 荧光原位杂交在无创性产前诊断中的应用[J]. 国际妇产科学杂志, 2008, 35(5): 359-361.
- [9] 金瑞林, 郑梅玲. 荧光原位杂交技术在诊断胎儿染色体异常中的应用及前景[J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11(5): 1-2.
- [10] Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 22 year multicenter retrospective study and review of the literature[J]. Prenat Diagn, 2001, 21(4): 293-301.
- [11] Scriven PN, Ogilvie CM. Fluorescence in situ hybridization on single cells. (Sex determination and chromosome rearrangements)[J]. Methods Mol Med, 2007, 132: 19-30.
- [12] Wiland E, Hobel CJ, Hill D, et al. A Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(1): 36-41.
- [13] Yang YH, Kim SH, Yang ES, et al. Prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 from maternal peripheral blood[J]. Yonsei Med J, 2003, 44(2): 181-186.
- [14] Writters I, Devriendt K, Legius E, et al. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. Prenat Diagn, 2002, 22(1): 29-33.
- [15] 张雪梅, 刘珊玲. 荧光原位杂交在未培养羊水细胞产前诊断中的临床应用研究[J]. 实用妇产科杂志, 2009, 25(9): 550-553.
- [16] Feldman B, Ebrahim SA, Hazan SL, et al. Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies[J]. Am J Med Genet, 2000, 90(3): 233-238.
- [17] Caine A, Nahby AE, Parkin CA, et al. Prenatal detection of down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment[J]. Lancet, 2005, 366(9480): 123-128.

(收稿日期: 2011-05-18)

不动杆菌耐药现状及耐药机制研究进展

余建华, 蔡冬平 综述, 钱超[△]审校(解放军第四五四医院检验科, 南京 210002)

【关键词】 不动杆菌; 耐药率; 耐药机制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 20. 043 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)20-2511-03

不动杆菌属是一种非发酵革兰阴性球杆菌, 它包括鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)、醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、洛菲不动杆菌(*A. lwoffii*)、琼氏不动杆菌(*A. junii*)等, 分布于自然界和医院环境中, 是人类皮肤、呼吸道、胃肠道、生殖道的正常菌群, 也是一种条件致病菌, 可引起各种感染和医院感染, 如腹膜炎、脑膜炎、骨髓炎、关节炎、菌血症及肺炎等。

近年来不动杆菌的临床分离率逐年提高, 尤其在重症监护病房和免疫力低下的患者中, 其中鲍曼不动杆菌最为常见, 在非发酵菌的感染中仅次于铜绿假单胞菌。随着临床抗菌药物的大量使用, 不动杆菌出现了多重耐药甚至全耐药株, 导致部分医院爆发不动杆菌流行, 给临床感染的治疗带来严峻的挑战^[1]。为临床合理选择抗菌药物提供依据以及避免细菌多重耐药性的发生, 对不动杆菌的耐药现状及耐药机制总结如下。

1 耐药现状

相关资料^[2-5]显示, 近几年来不动杆菌的耐药率上升趋势明显, 碳青霉烯类抗菌药物的耐药率逐年增加, 从 4.5% 升至 20.56%, 多重耐药菌株从 33% 升至 48%。耐亚胺培南不动杆菌在中国台湾地区达 25%, 在澳大利亚和中国大陆地区达 20% 左右。目前我国绝大多数菌株对亚胺培南、美罗培南、头孢哌酮/舒巴坦、黏菌素和多黏菌素敏感率较高。

2 耐药机制

2.1 对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药机制 不动杆菌对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药机制主要是产生水解酶(β -内酰胺酶), 以水解和非水解的方式破坏抗菌药物 β -内酰胺环, 使抗菌药物失

活; 在所有的 β -内酰胺酶中, 那些具有水解碳青霉烯活性的酶最受关注, 包括丝氨酸苯唑西林酶(Ambier D 类)和金属 β -内酰胺酶(Ambler B 类)。以下是 4 种 β -内酰胺酶的耐药机制分析。

2.1.1 超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs/A 类 β -内酰胺酶) 这类酶是肠杆菌科细菌(特别是肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌)对广谱头孢菌素产生耐药机制的最主要原因, 目前在不动杆菌中也分离到了 ESBLs, 它通常由质粒介导, 能对多种不同的 β -内酰胺类抗菌药物产生耐药, 如青霉素类、单酰胺类及部分头孢菌素类, 但对碳青霉烯类敏感, 多数能被克拉维酸抑制。在不动杆菌属中 blaTEM、blaSHV、blaCTX-M 等较为常见, CTX-M 对头孢曲松和头孢噻肟具有优先水解的特性^[6]。

2.1.2 金属酶(MBLs/B 类 β -内酰胺酶) 此类酶在参与催化反应时, 在活性位点上需要金属离子, 通常为锌离子, 因此被称为金属酶^[7]。在不动杆菌中的 MBLs, 主要为 IMP 型、VIM 型和 SIM 型。能水解所有的 β -内酰胺类抗菌药物, 包括碳青霉烯和广谱头孢菌素, 对酶抑制剂不敏感, 但对乙二胺四乙酸(EDTA)敏感。

2.1.3 头孢菌素酶(AmpC 酶/C 类 β -内酰胺酶) 由染色体或者质粒介导, 可以分解三代头孢菌素及单环酰胺类, 不被克拉维酸抑制, 可被氯唑西林抑制, 对碳青霉烯类和二代头孢类药物较为敏感, 但对三代头孢和头霉烯类抗菌药物耐药, 而且此类抗菌药物如头孢西丁和亚胺培南具有诱导 AmpC 酶(PI > 9.0)高产。2005 年在美国的克利夫兰的大医院监测到一类

[△] 通讯作者, E-mail: love96122@sohu.com。